

苹果树腐烂病菌挥发性代谢产物的分离提取与致病性研究

袁艮霞¹,李思南²,秦 辰³,王 惠^{1*},黄丽丽^{2*}

(1. 西北农林科技大学 理学院,陕西 杨陵 712100;2. 西北农林科技大学 植物保护学院,陕西 杨陵 712100;
3. 西北农林科技大学 农学院,陕西 杨陵 712100)

摘 要:为了研究苹果树腐烂病菌的致病活性物质,本研究利用 MS 液体培养基培养苹果树腐烂病菌,采用普通蒸馏法用乙酸乙酯作溶剂,收集其培养滤液中的挥发性代谢产物,利用气相色谱质谱联用仪(GC-MS)分离各个成分,将各组分质谱图与数据库标准物质质谱图对比,初步进行结构定性,用苹果枝条进行致病活性测定。结果表明,苹果树腐烂病菌在发酵过程中产生的 2 种挥发性物质的结构分别为异戊醇和 2-苯乙醇,这 2 种物质均对苹果树枝具有致病活性。

关键词:苹果树腐烂病菌;挥发性代谢产物;致病性;GC-MS

中图分类号:S436.611 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2018)01-0211-05

Isolation, Extraction and Pathogenicity Studies of Volatile Metabolites from *Valsa mali*

YUAN Gen-xia¹, LI Si-nan², QIN Chen³, WANG Hui^{1*}, HUANG Li-li^{2*}

(1. College of Science, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. College of Plant Protection, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
3. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *Valsa mali* was cultured in MS liquid medium to explore its pathogenic active substances. Its volatile metabolites were collected by distillation method with ethyl acetate as absorbing solvent. Volatile constituents dissolved in ethyl acetate were separated and identified by GC-MS. To confirm the structure of each component, their mass spectra were compared with those of standard substances in the database, and their bioactivities were tested on apple branches. Two substances obtained from the culture filtrate were 3-methylbutan-1-ol and 2-phenylethan-1-ol respectively. Both of these substances showed pathogenic activity against apple branches.

Key words: *Valsa mali*; volatile metabolites; pathogenicity; GC-MS

随着苹果种植面积的不断扩大,苹果树腐烂病日趋严重,已经严重影响到我国苹果产业的进一步发展。苹果树腐烂病俗称臭皮病、烂皮病、串皮病,是由黑腐皮壳属真菌(*Valsa mali*)引起的树枝干皮层腐烂病害^[1],由于对其致病机理还不十分清楚,导致对该病的防治比较盲目。要想搞清楚致病机理,必须对其分泌的致病活性物质进行研究。目前对苹果树腐烂病菌代谢产物的研究主要集中在酶类物质、根皮苷的降解产物、异香豆素类物质、有机酸类

等^[2-10]。也有研究表明,苹果树腐烂病菌分泌的蛋白类物质有致病活性^[11],但关于其挥发性成分目前还尚未见研究报道。

本试验对苹果树腐烂病菌的 MS 培养滤液中的挥发性成分进行分离提取和结构定性,以苹果树枝条为生物测定材料进行致病性检测,初步确定苹果树腐烂病菌代谢的挥发性成分与致病的关系,以期为该病菌致病机理的研究提供依据。

收稿日期:2017-03-02 修回日期:2017-05-13

基金项目:国家重点研发计划(2016YFD0201108);陕西省科技统筹计划。

作者简介:袁艮霞,女,在读硕士,研究方向:天然产物。E-mail:1226206475@qq.com

* 通信作者:王 惠,女,博士,教授,硕士生导师,研究方向:天然农用活性物质。E-mail:wanghuiab@sina.com

黄丽丽,女,硕士,教授,博士生导师,研究方向:植物病害综合防治。E-mail:lilyhuangk@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与培养基 苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8,由西北农林科技大学植物保护学院果树病害病原生物学及综合防治研究团队提供,于 PDA 培养基 4℃ 保存。

MS 培养基:取蔗糖 5 g,L-天门冬酰胺 2 g,磷酸二氢钾 1 g,七水合硫酸镁 0.5 g,七水合硫酸锌 0.88 g,微量元素:水合硝酸铁 1.5 mg,五水合硫酸锰 0.44 mg,V_H 0.005 mg,V_{BI} 0.1 mg,于 1 000 mL 水中,每 1 000 mL 培养基中加 100 μL 微量元素,pH 为 5~8。

1.1.2 仪器与试剂 气相色谱-质谱联用仪:QP201Vltra 型。乙酸乙酯:色谱纯,天津市科密欧化学试剂有限公司。异戊醇,2-苯乙醇均为市售分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 培养滤液的制备 先将菌株 03-8 接种至 PDA 培养基上,于 25℃ 培养 3 d。用直径 5 cm 的打孔器沿菌落边缘打出菌株长势均匀的菌饼接种于 MS 液体培养基中,并设置空白对照,25℃ 进行培养,每天摇瓶 1 次,培养 20 d。用布氏漏斗抽滤得到培养滤液。

1.2.2 挥发性代谢产物的收集 取上述培养滤液 300 mL 于圆底烧瓶中,进行普通蒸馏,用 10 mL 乙酸乙酯收集馏分,收集液封口保存于 4℃ 冷藏箱中。

1.2.3 挥发性代谢产物的定性分析 取收集液在如下 GC-MS 条件下进行分析测定,GC-MS 条件:石英毛细管柱(30.0 m×0.25 mm),升温程序 60~100℃(10℃·min⁻¹),100~240℃(4℃·min⁻¹,240℃ 保留 3 min),柱流量 1.0 mL·min⁻¹。接口温度 230℃ 外,进样量 2 μL,载气 He 进样方式为不分流,柱流量 1.11 mL·min⁻¹,吹扫流量 3 mL·min⁻¹。EI 源,电子能量 70 eV,离子源温度 200℃,

接口温度 220℃,扫描质量范围 50~500。通过与谱库标准物质质谱图对照初步确定收集液中各成分的结构。

1.2.4 纯物质对苹果树枝条的致病活性测定方法

枝条的准备:取粗细和长短相等且长势相近的健康苹果树枝 30 支,用 0.6% 的次氯酸钠溶液浸泡 10 min 进行消毒,然后用无菌水漂洗 3 次,于超净工作台上晾干,用石蜡封在形态学上端以防止过多水分散失,用湿润棉花包裹形态学下端保湿,保证试验过程中枝条存活。

活性测定:先用灼烧后的打孔器在每个枝条中间表面造成伤口,然后分 2 组处理进行试验,第 1 组用微量注射器在枝条伤口处分别滴异戊醇 10 μL 和 2-苯乙醇 10 μL,每个样品处理 3 个枝条。以未滴加任何物质的带伤枝条为对照,保存在密封的培养皿中,在恒温培养室中进行培养,定期观察;第 2 组在伤口上除滴加相应待测物质后,再将 PDA 上培养了 3 d 的苹果树腐烂病菌野生型菌株 03-8 菌饼接于伤口处,其余条件保持与第 1 组一致。置于 25℃ 恒温室中培养,80 h 后进行病斑大小测定。病斑面积大小以长直径与短直径的乘积表示。

1.2.5 数据分析 数据处理均经过 SPSS(16.0)软件进行差异显著性分析,采用 LSD 法。

2 结果与分析

2.1 挥发性代谢产物的结构确定

用 GC-MS 分别对空白培养基及培养滤液的收集液进行定性分析得到色谱图(图 1)。图 1 培养滤液中的 2 个挥发性组分 A 和 B 的对应质谱图分别见图 2(A)和(B)中上图,在数据库中发现的与其相似度最高的相应标准物质质谱图见图 2(A)和(B)中下图。与谱库中标准物质对比得到的相应挥发性代谢产物的结构见图 3。由图 3 可知,这 2 种物质分别为异戊醇和 2-苯乙醇。

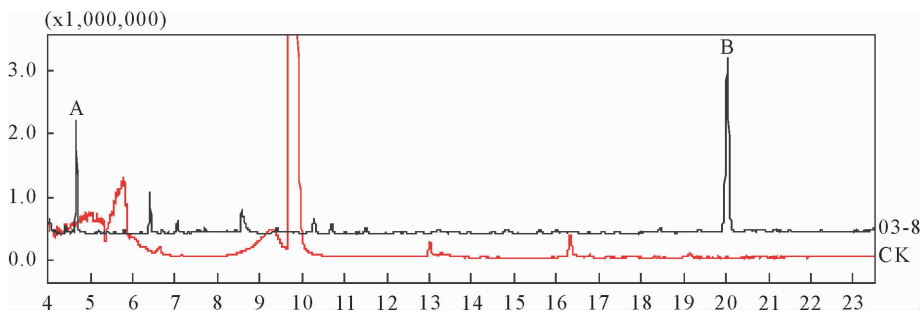


图 1 空白培养基及苹果树腐烂病菌 03-8 的 MS 培养滤液中挥发性代谢物的色谱图
Fig.1 Chromatogram of volatile metabolites in pure medium and MS culture filtrate of *Valsa mali* 03-8

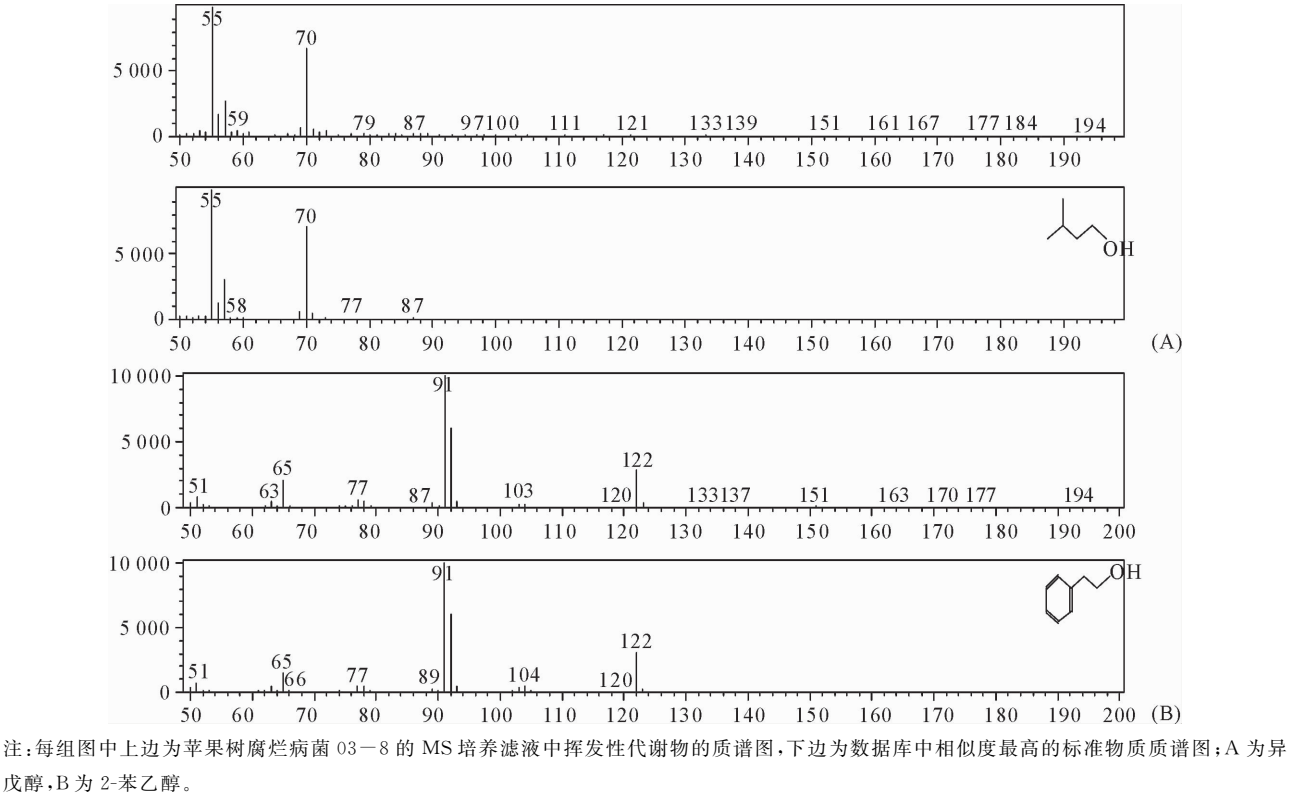


图 2 苹果树腐烂病菌 03—8 的 MS 培养滤液中 2 种挥发性代谢物的质谱图及谱库对比图

Fig. 2 Comparison of mass spectra of two volatile metabolites in MS culture filtrate of *V. mali* 03—8 with standard spectra

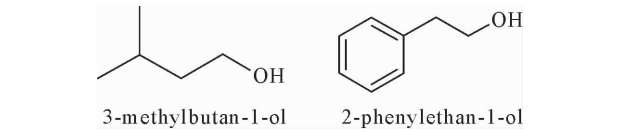


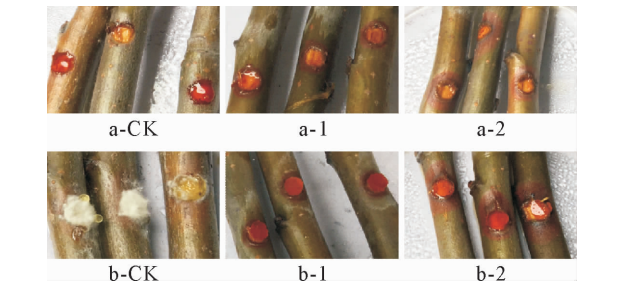
图 3 苹果树腐烂病菌 03—8 的 MS 培养滤液中 2 种挥发性代谢物的结构

Fig. 3 Structures of two volatile metabolites in MS culture filtrate of *V. mali* 03—8

2.2 异戊醇和 2-苯乙醇的生物活性

利用苹果枝条作为生测对象,检测纯异戊醇和 2-苯乙醇的生物活性结果见图 4。由图 4 可以看出, b-ck 的病斑大小明显>a-CK,说明本试验使用的苹果树腐烂病菌具有明显的致病性。从图 4 还可以看出, a-CK 枝条上没有显示病斑,而 a-1 和 a-2 枝条上明显有病斑,表明异戊醇和 2-苯乙醇均对苹果树枝具有致病活性。另外图 4 还显示, b-1 和 b-2 与 b-CK 相比,只有 b-CK 菌丝能够正常生长,而滴加异戊醇和 2-苯乙醇后再接的菌饼几乎没有菌丝生长的迹象,表明这 2 种化合物对 03—8 的生长具有明显抑制作用。

对图 4 中各处理的致病斑面积大小进行统计的结果见表 1。对表 1 中各组数据进行显著性分析的结果见表 2。表 1 和表 2 表明, a-1 和 a-2 的病斑大小均与 a-CK 在 $P=0.05$ 水平上差异显著,说明异戊醇和 2-苯乙醇对苹果树枝条具有明显的致病活性。



注: a-ck: 伤口未处理; a-1: 伤口+异戊醇; a-2: 伤口+2-苯乙醇; b-ck: 伤口+菌饼; b-1: 伤口+异戊醇+菌饼; b-2: 伤口+2-苯乙醇+菌饼。菌饼: 苹果树腐烂病菌 03—8 菌饼。

图 4 异戊醇和 2-苯乙醇对苹果树枝条的致病活性测定结果

Fig. 4 Bioactivity on apple tree branches of 3-methylbutan-1-ol and 2-phenylethan-1-ol

从表 1 和表 2 可以看出, b-1 与 b-CK 差异显著,而且 b-1 的病斑明显<b-CK,表明在加有异戊醇的枝条伤口上接 03—8 菌饼,枝条上的病斑不但没有加强,反而比伤口上直接接菌饼的病斑小;同时将 a-1 和 b-1 进行比较发现,滴有异戊醇的枝条上不接菌饼和接菌饼产生的病斑大小无显著性差异。表明异戊醇的存在抑制了 03—8 菌饼的致病活性。

从表 1 和表 2 还可以看出, b-2 与 b-CK 差异不显著,似乎意味着在菌饼存在时 2-苯乙醇没有显示出致病活性;但将 a-2 和 b-2 进行比较发现, a-2 和 b-2 也无显著性差异,似乎在 2-苯乙醇存在时菌饼没有表现出致病活性。综合分析认为是 2-苯乙醇

的存在抑制了 03—8 菌饼的致病活性。

表 1 苹果枝条接触挥发性代谢物后的病斑面积

Table 1 Lesion size of apple branches after contacting with the volatile metabolites of *Valsa mali*

代号	试剂	接菌情况 (有,无)	病斑面积 平均值/cm ²
a-CK	无	无	0.25±0.02
a-1	异戊醇	无	0.58±0.04
a-2	2-苯乙醇	无	1.4±0.67
b-CK	无	有	1.47±0.43
b-1	异戊醇	有	0.5±0.05
b-2	2-苯乙醇	有	1.49±0.14

注:a-CK:伤口未处理;a-1:伤口+异戊醇;a-2:伤口+2-苯乙醇;b-CK:伤口+菌饼;b-1:伤口+异戊醇+菌饼;b-2:伤口+2-苯乙醇+菌饼。菌饼:苹果树腐烂病菌 03—8 菌饼。

表 2 苹果枝条接触挥发性代谢物后的病斑面积的显著性分析结果

Table 2 Significance analysis of the lesion size of Apple branches after contacting with the volatile metabolites of *Valsa mali*

代号	a-CK	a-1	a-2	b-CK	b-1	b-2
a-CK		A	A	A		
a-1	A				B	
a-2	A					B
b-CK	A				A	B
b-1		B		A		
b-2			B	B		

注:A 表示有显著性差异,B 表示无显著性差异($P<0.05$)。

3 结论与讨论

3.1 异戊醇和 2-苯乙醇是苹果树腐烂病菌的代谢产物

本试验从苹果树腐烂病菌的发酵液中分离得到 2 个挥发性化合物:异戊醇和 2-苯乙醇,为了确认,试验中同时改变了培养基进行培养,在培养滤液中也检测到这 2 种挥发性成分,表明这 2 种物质是苹果树腐烂病菌的代谢产物。目前还尚未见到从苹果树腐烂病菌甚至从其他果树病害的病原菌代谢产物中分离到这 2 种物质的报道,仅有从植物及其他微生物中分离得到这 2 种物质的报道^[12-16]。

3.2 异戊醇和 2-苯乙醇是苹果树腐烂病菌的致病活性物质

本试验发现异戊醇和 2-苯乙醇对苹果树枝条均有直接的致病活性,表明它们就是苹果树腐烂病菌的致病活性物质。另外,本试验在进行 2 种挥发性物质的生物活性测定中发现,在滴加了异戊醇的苹果树枝条上接苹果树腐烂病菌的菌饼和不接菌饼,产生的病斑大小在统计分析时差异不显著。在滴加了 2-苯乙醇的枝条上同样接苹果树腐烂病菌菌饼,与不接菌饼产生的病斑大小在统计分析时差异也不显著。表明异戊醇和 2-苯乙醇的存在都抑制了苹果树腐烂病菌的正常致病性。分析认为,这

2 种物质都是苹果树腐烂病菌在对苹果树致病过程中产生的致病活性成分,由于致病过程中代谢产生的物质质量很少,逐渐进入树体对病原菌本身并无明显抑制作用,使病原菌可以继续代谢进一步发挥致病作用。而本试验直接使用了 10 μL 纯物质,其浓度远大于病原菌分泌的量,相当于在生物合成反应体系中突然出现了大量的产物,抑制了正反应的进行,因此病原菌分泌异戊醇和 2-苯乙醇的反应受到抑制,也就是病原菌的致病作用受到了抑制。这进一步佐证了异戊醇和 2-苯乙醇是苹果树腐烂病菌的致病活性物质这一论点。

这一点在之前的文献中也尚未见报道,只有一些关于异戊醇和 2-苯乙醇作为香气成分的报道^[15-17]。

3.3 异戊醇和 2-苯乙醇具有抑菌活性

本试验发现在苹果树枝条上滴加了异戊醇或 2-苯乙醇后再接腐烂病病原菌时,该菌不但不能致病,而且没有了生长的迹象,表明这 2 种物质在 10 μL 的量上就可以抑制该菌的生长。关于苯乙醇的抑菌活性曾有报道。陈利军^[18]等分析了 1 株分离自淡竹的产香真菌蒙塔涅梨孢假壳的挥发物成分,发现其能够不同程度地抑制 5 种植物病原真菌的生长,其中主要成分为苯乙醇,说明苯乙醇本身具有抑菌作用。

3.4 异戊醇可能是苹果树腐烂病菌致病过程中产生的中间体

在进行 2 种挥发性物质的活性试验中发现,在滴加纯异戊醇的枝条上接苹果树腐烂病菌菌饼,其病斑比直接接菌饼反而小,分析认为可能是本试验使用的异戊醇的浓度过高抑制了苹果树腐烂病菌的正常生长。另外,黄丹^[19]等从浓香型大曲中分离得到一株产酯化酶霉菌,鉴定为黄曲霉(*Aspergillus flavus*)通过 GC-MS 对其代谢产物分析发现其中含有异戊醇及 2-苯乙醇,随着时间的延长,这 2 种化合物会逐渐转化为对应的酸及酯,其代谢产物的合成大致呈醇-酸-酯的变化规律。对从中分离到的细菌嗜热葡萄糖苷酶芽胞杆菌的发酵液进行分析,也发现随着培养时间的延长,异戊醇等各种高级醇逐渐减少甚至消失,而酯类物质则逐渐增加^[20]。张静^[21]等通过 SPME-GC-MS 测定不同品种牡丹花在 3 个开花时期的挥发性物质成分,发现花蕾期以醇类为主,盛花期和衰花期酯类物质含量均增加。联系到苹果树腐烂病菌培养后期散发出特殊的气味,因此推测,在含有低浓度异戊醇时,苹果树腐烂病菌能够利用异戊醇合成其他的代谢产物,而当异戊醇浓度达到一定的限度后就会抑制相应的反应。至于这 2 种挥发性

物质在苹果树腐烂病菌中的代谢途径及其在致病机理中的作用还有待进一步的研究及验证。

参考文献:

[1] WANG X, WEI J, HUANG L, *et al.* Re-evaluation of pathogens causing *Valsa canker* on apple in China [J]. *Mycologia*, 2011, 103(2): 317.

[2] 刘福昌, 李美娜, 王永淦. 苹果树腐烂病菌致病因素——果胶酶的初步探讨[J]. *中国果树*, 1980(4): 45-48.

[3] 王娟, 马强, 庄霞, 等. 苹果腐烂病原菌分泌物中果胶酶的测定[J]. *内蒙古农业科技*, 2009(4): 39-40.
WANG J, MA Q, ZHUANG X, *et al.* Determination of pectinase in fungi secretion of apple tree canker [J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2009(4): 39-40. (in Chinese)

[4] 王建华, 柯希望, 黄以超, 等. 苹果树腐烂病菌发酵液中根皮苷主要降解成分的分析[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2012(8): 89-94.
WANG J H, KE X W, HUANG Y C, *et al.* Component analysis of *Valsa mali* var. *mali* fermentation liquid degrading phlorizin [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat. Sci. Ed.*, 2012(8): 89-94. (in Chinese)

[5] 何媛媛, 于哲, 王海英, 等. 不同碳氮源对苹果腐烂病菌胞外果胶酶活性的影响[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2014(11): 81-86.
HE Y Y, YU Z, WANG H Y, *et al.* Effects of different carbon and nitrogen sources on activity of extracellular pectinase of *Valsa mali* var. *mali* [J]. *Journal of Northwest A&F University: Nat. Sci. Ed.*, 2014(11): 81-86. (in Chinese)

[6] 柯希望. 苹果树腐烂病菌在树皮组织内的扩展观察[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2009.

[7] NATSUME H, SETO H, OTAKE N. Studies on apple canker disease. The necrotic toxins produced by *Valsa ceratosperma* [J]. *Agricultural & Biological Chemistry*, 1982, 46(8): 2101-2106.

[8] KOGANEZAWA H, SAKUMA T. Possible role of breakdown products of phloridzin in symptom development by *Valsa ceratosperma* [J]. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*, 1982, 48(4): 521-528.

[9] TRAQUAIR J. Oxalic acid and calcium oxalate produced by *Leucostoma cincta* and *L. persoonii* in culture and in peach bark tissues [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1988, 65(9): 1952-1956.

[10] SVIRCEV A M, BIGGS A R, MILES N W. Isolation and partial purification of phytotoxins from liquid cultures [J]. *Canadian Journal of Botany*, 1991, 69(9): 1998-2003.

[11] 王建华. 苹果树腐烂病菌致病物质的初步研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2012.

[12] 祝云飞, 黄治国, 邓杰, 等. 浓香型大曲中一株酵母菌的分离鉴定及其挥发性产物分析[J]. *四川理工学院学报: 自然科学版*, 2016, 29(1): 7-11.

[13] 白岩岩, 贾薇, 张劲松. 樟芝发酵液挥发性物质提取方法及成分比较[J]. *食品科学*, 2013, 34(24): 163-167.
BAI Y Y, JIA W, ZHANG J S. Comparison of different ex-

traction methods for the analysis of volatile components of the fermentation broth of *Taiwanofungus comphoratus* [J]. *Food Science*, 2013, 34(24): 163-167. (in Chinese)

[14] 王丽娟, 刘苏萌, 楚明忠. 百合产香内生真菌的分离鉴定及其挥发性成分分析[J]. *食品工业*, 2013(9): 203-205.
WANG L J, LIU S M, CHU M Z. Isolation and identification endophytic fungi from *Lilium* Siberia and analysis of volatile components [J]. *The Food Industry*, 2013(9): 203-205. (in Chinese)

[15] 谷运雅, 宦月琴, 钱莉群, 等. 天然肉桂酸及其酯类的制备[J]. *香料香精化妆品*, 2013(Supp. 1): 36-38.
GU Y C, HUAN Y Q, QIAN L Q, *et al.* The synthesis of natural cinnamic acid and its esters [J]. *Flavour Fragrance Cosmetics*, 2013(Supp. 1): 36-38. (in Chinese)

[16] 晏慧君, 王娟, 陈敏, 等. 朋粉(*Rosa chinensis* ‘Pallida’)、大马士革蔷薇(*R. damascene*)、百叶蔷薇(*R. centifolia*)香气成分分析[J]. *云南农业大学学报: 自然科学*, 2017, 32(1): 78-82.
YAN H J, WANG J, CHEN M, *et al.* The analysis of scent compounds from *Rosa chinensis* ‘Pallida’, *R. damascene* and *R. centifolia* by GC/MS [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science*, 2017, 32(1): 78-82. (in Chinese)

[17] 曹建宏, 张振文, 张莉, 等. 霞多丽干白葡萄酒香气成分的GC/MS分析[J]. *西北林学院学报*, 2006, 21(4): 132-134.
CAO J H, ZHANG Z W, ZHANG L, *et al.* Analysis of roma components of chardonnay dry white wine by GC/MS [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2006, 21(4): 132-134. (in Chinese)

[18] 陈利军, 王国君, 田雪亮, 等. 产香真菌 ZY-2 菌株鉴定及其挥发性物质抑菌活性测定与组分分析[J]. *南方农业学报*, 2013, 44(11): 1818-1822.
CHEN L J, WANG G J, TIAN X L, *et al.* Identification of an aroma-producing fungus ZY-2 and its analysis on antifungal activity and chemical component of volatile compounds [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44(11): 1818-1822. (in Chinese)

[19] 黄丹, 方春玉, 尚志超, 等. 一株酯化酶霉菌的分离、鉴定及代谢产物特征[J]. *中国酿造*, 2010, (6): 62-64.
HUANG D, FANG C Y, CHU Z C, *et al.* Isolation and identification of esterase-produce mould and characterization of its metabolites [J]. *China Brewing*, 2010(6): 62-64. (in Chinese)

[20] 黄丹, 方春玉, 储玉龙, 等. 一株酯化酶细菌的分离、鉴定及代谢产物特征[J]. *四川理工学院学报: 自然科学版*, 2010(3): 321-323.
HUANG D, FANG C Y, CHU Y L, *et al.* Isolation and characterization of bacteria producing esterifying enzyme [J]. *Journal of Sichuan University of Science & Engineering: Natural Science Edition*, 2010(3): 321-323. (in Chinese)

[21] 张静, 周小婷, 胡立盼, 等. SPME-GC-MS 测定不同品种牡丹花挥发性物质成分分析[J]. *西北林学院学报*, 2013, 28(4): 136-143.
ZHANG J, ZHOU X T, HU L P, *et al.* SPME-GC-MS measurement of volatile in different peony varieties [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2013, 28(4): 136-143. (in Chinese)